

氏名	小柳津 功 介
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1580号
学位授与の日付	平成9年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	<i>Porphyromonas gingivalis</i> の外膜に存在する53kDa 蛋白 のB細胞エピトープ
論文審査委員	教授 福井一博 教授 村山洋二 教授 渡邊達夫

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

生体に侵入した抗原は抗原特異的なB細胞レセプターによって認識された後、B細胞内に取り込まれ、HLA-抗原ペプチド複合体を形成する。この複合体はT細胞に提示され、T細胞を活性化する。活性化T細胞によって活性化されたB細胞は浆細胞に分化・増殖し、抗体を産生する。このB細胞レセプターによって認識される抗原決定基がB細胞エピトープである。従って、個体間の体液性免疫応答性の違いは個体がB細胞エピトープをどの様に認識するかによって決定される。また、病状が個体間で異なることの病理もB細胞エピトープに対する応答性の違いとして捉えることができる。

P. gingivalis (Pg)は代表的な歯周病の原因菌である。このPgの外膜に存在する53kDa蛋白 (Ag53)は多くの歯周病患者血清によって認識される抗原性の強い蛋白であるが、Ag53に対する体液性免疫応答性は患者間に様ではない。しかし、いかなる要因がAg53に対する体液性免疫応答性を規定しているかは未だ解明されていない。

本研究は、Ag53のB細胞エピトープを決定し、その免疫学的性状を明らかにすることを目的とした。

【材料ならびに方法】

1. 試供菌およびAg53の調製

Ag53はPg381株の外膜からKokuguchiらの方法に従って調製した。

2. 血清

Pg381株の超音波破砕性抗原に対して高い抗体価 (Murayamaらの基準に基づく220ELISA単位以上)を示す歯周病患者11名の末梢血血清を被験血清とした。なお、6名の小児健常者の血清を、Pgに対する抗体を含まないコントロール血清とした。

3. Ag53に対する血清の検出

ELISAによってAg53に反応する血清のIgG抗体価を405nmにおける吸光度 (OD405)で測定し、高い抗体価を示す血清を検出した。なお、IgGおよびそのサブクラスの抗体価は、特に断わらない限り、以下同様にして表わした。

4. B 細胞エピトープ同定

Ag 53 を構成するアミノ酸配列をもとに合成したペプチドを被験血清 IgG 抗体に反応させ、強い反応を示す合成ペプチドを特定することによって B 細胞エピトープを含む合成ペプチドおよび B 細胞エピトープを特定した。すなわち、Ag 53 を構成するアミノ酸を全てカバーするように Epitope Scanning Kit (Chiron Minotopex) でペプチドを合成し、被験血清ごとに合成ペプチドに対する抗体価を測定した後、抗体価に吸光度の平均値 $+ 2 \times$ 標準偏差を超える値を与えるペプチドを特定することによってした。

5. B 細胞エピトープおよび Ag 53 に対する血清 IgG サブクラス抗体価の測定

エピトープに対する血清 IgG サブクラス (IgG1-4) の抗体価は、前述に従って測定した。Ag 53 に対する血清 IgG サブクラスの抗体価は、ヒト IgG サブクラス標準曲線から算出した。

6. Ag 53 の抗体親和性の測定

Ag 53-IgG 抗体反応系に各種モル濃度のチオシアン酸アンモニウムを加え、一定時間後に、反応液の OD₄₀₅ の 50% を減じるに要したチオシアン酸アンモニウムのモル濃度をもって抗体親和性 (ID₅₀) とした。

7. 統計処理

血清中 IgG 抗体価の有意差検定は Mann-Whitney の U 検定によった。また、Ag 53 の抗体親和力に関する検定には Spearman の順位相関係数を用いた。

【結果】

1. Ag 53 に対する血清 IgG 抗体価

Ag 53 に対する血清 IgG 抗体価はすべての患者血清においてコントロール血清より高く検出された ($P < 0.001$)。

2. エピトープの同定

11 被験血清のうち、Ag 53 に対して高い血清 IgG 抗体価を示した 6 被験血清を用いて、B 細胞エピトープを含むペプチドを 13 種合成し、そのうち多くの被験血清によって認識される 3 種の B 細胞エピトープ YYLQ, MSPARR および RAAIRAS を特定した。

3. ペプチドおよび Ag 53 に対する血清 IgG サブクラス抗体価

Ag 53 に対して高い抗体価を示した 6 被験血清の IgG サブクラス抗体価を測定した。抗体価に高い値を与えた 4 種の合成ペプチドに対する 6 被験血清の IgG サブクラス抗体価は IgG2 のみが高く、IgG1, 3 および 4 は極めて低かった。一方、Ag 53 に対する IgG サブクラス抗体価は血清間で異なった。すなわち、4 患者血清において IgG2 が、そして、他の 2 患者血清においては IgG1 がそれぞれ高かった。なお、IgG3 および IgG4 抗体は 6 被験血清いずれにおいてもほとんど検出されなかった。

4. Ag 53 の抗体親和性

Ag 53 に対して高い抗体価を示した 6 被験血清のうち、5 被験血清に対する Ag 53 の ID₅₀ はほぼ同じ値を示した。しかし、他の 1 被験血清 (IgG2 に富む) に対するそれは前者の 2 分の 1 以下の値であった。Ag 53 に対する血清 IgG 抗体価に占める各サブクラス抗体価の割合と抗体親和性の相関はいずれにおいてもなかった。

【考察ならびに結論】

P. gingivalis の外膜タンパク質の 1 つである 53 kDa タンパク質の B 細胞エピトープを含む 13 種のペプチドを合成し、多くの歯周病患者によって認識される 3 種の B 細胞エピトープ YYLQ, MSPARR および RAAIRAS を特定した。それらの B 細胞エピトープは IgG2 抗体によって認識され、疎水性を示すという特徴を有していた。

論文審査結果の要旨

本論文は、歯周病細菌として注目されている *Porphyromonas gingivalis* の外膜蛋白の 1 つである 53 kDa 蛋白の B 細胞エピトープを特定し、その性状を明らかにしたものである。

論文には次の知見が記されている。

1. 53 kDa 蛋白のアミノ酸配列を全てカバーする 10 アミノ酸残基から成る 89 種のペプチドを合成した。この蛋白を認識する歯周病患者血清を用いて、特に高い抗体価を与える 3 種の合成ペプチドを特定した後、これら 3 種のペプチドの全アミノ酸配列をカバーする 22 種の 10 アミノ酸残基のペプチドを新たに合成し、高い抗体価を与える 16 種の合成ペプチドを再度特定した。それら 16 種の合成ペプチドに共通して含まれるアミノ酸配列は RAAIRAS, YYLQ および MSPARR であり、このものを B 細胞エピトープと同定した。
2. 特定した B 細胞エピトープは疎水性を示し、IgG2 抗体によって認識された。

これらの知見は、歯周病の病態を *Porphyromonas gingivalis* の B 細胞エピトープ認識の面から示し得ることを示唆するとともに、53 kDa 蛋白の B 細胞エピトープをワクチンとして開発する上で参考になると評価した。

従って、本申請論文は学位論文として価値があるものと認める。